

除虫菊和茼蒿核糖体 DNA ITS 区的序列*

高娟¹, 邱明华^{1**}, 张亚平²

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223)

Nucleotide Sequences of the Internal Transcribed Spacer Region of rDNA in *Pyrethrum cineræfolium* and *Chrysanthemum segetum*

GAO Juan¹, QIU Ming-Hua¹, ZHANG Ya-Ping²

(1 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2 Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Key words: *Pyrethrum cineræfolium*; *Chrysanthemum segetum*; rDNA; ITS1; ITS2

关键词: 除虫菊; 茼蒿; rDNA; ITS1; ITS2

中图分类号: Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2001)01-0052-03

除虫菊 (*Pyrethrum cinerariifolium*), 又称白花除虫菊, 是众所周知的著名杀虫植物, 也是目前世界上唯一集约化栽培的天然杀虫剂原料, 至今仍为肯尼亚、厄瓜多尔等一些国家的支柱产业。除虫菊的头状花序中含有 6 种 0.4%~2% 的杀虫成分, 即除虫菊酯 I, II (pyrethrin-I, II), 瓜菊酯 I, II (cinerin-I, II) 和茉莉菊酯 I, II (Jasmolin-I, II), 6 个成分组成的复合植物杀虫剂, 对家蝇的杀虫活性 LD₅₀ 为 15~20 µg/g, 对大白鼠的毒性 LD₅₀ 为 2124~2416 mg/kg, 对温血动物毒性更低。面对呼唤绿色产业的 21 世纪, 除虫菊的产业开发又成为天然农药开发的一个热点。我们在进行除虫菊产业化开发研究时, 注意到该资源植物的分子生物学研究未见报道, 而进行了除虫菊的 rDNA 间隔序列片段 (ITS1, ITS2) 碱基序列的分析。除虫菊属于小黄菊属 (*Pyrethrum*), 另一种重要的经济作物, 在我国南方各省栽培作蔬菜食用的茼蒿 (*Chrysanthemum segetum*) 则是菊属较有代表性的植物, 也尚未有分子生物学的报道。

核糖体 DNA 间隔序列片段 (ITS1 和 ITS2) 位于 rDNA 的 18S rDNA 和 26S rDNA 之间, ITS1 和 ITS2 间还有一段保守的 5.8S rDNA。ITS 区段是一段高度重复的序列片段, 且其侧翼片段均为保守的片段, 所以广泛应用于植物分子生物学研究。我们用 DNA 序列分析技术测定除虫菊和茼蒿的 rDNA 的 ITS 区间的碱基序列, 并与菊科其它属的研究结果比较, 以期获得它们特征的遗传信息, 更好地开发利用这两种经济植物。本文报道了这些研究结果。

* 基金项目: 中科院重大项目和院长基金、云南省人才基金资助。

** 通讯联系人

收稿日期: 1999-12-27, 2000-09-11 接受发表

材料和方法

除虫菊的新鲜叶片由云南泸西森菊公司除虫菊种植基地提供, 茼蒿新鲜叶片为昆明茨坝集市上购得。

按照 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 法提取总 DNA (clark, 1998)。

PCR 扩增的目的片段为 rDNA 的 ITS 区段, 包括 ITS1, 5.8s rDNA 和 ITS2, 共 610bp 左右。扩增引物为: F 5' - AAGGTTTCCGTAGGTGAAC - 3', R 5' - TATGCTTAACTCAGCGGG - 3' (Cerbak 等, 1998)。

每个 PCR 反应总体积为 50 μ L, PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 再以 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1'20" 秒进行 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min。扩增得到的 PCR 反应产物经 2.0% 的低熔点琼脂糖凝胶 (美国 FMC 公司) 电泳, 切下所需的带, 用 DNA 回收柱 (上海华舜生物工程公司) 进行回收, 检测后用于测序。DNA 测序用美国 ABI 公司的 377 型全自动序列分析仪。Dye-terminator cycle sequencing (Perkin-Elmer) Kit 对每个个体进行正反两条链测序。

根据正反两条序列获得完整的基因序列, 应用软件为 Megalign. (DNASar Inc. 1996)。排列如图 1。

```

1      GCAA-AGCAT AACGACCGT GAACAAGTAA AAACAACCGA GGGTCAGTG CATTAAACAC TT-GCTTGAT CCTCTCGA-T
2      .....G ..... T..T.....C.....G.....GT ..T.T.....GG.
1      GCTTTGTCGA TGTGCATTA CTGT-GTTC TTTTGACAC GGTGAATGCG TCATTGGGCG AATAGCAACC CCCGGCACAA
2      .....A...C.A...C.....G.CT T...G..T.....
1      TGTGTGCCAA GAAAACTAA ACTTAAGAAG -GCTGTGTT CGTGTT-GCC CCGTTCGGCG TGTGCTCATG GGAAGTGGCT
2      ..C.....A...T.....T.....
1      TCTTTATAAT CAGAAA-CGA CTGTGCGCAA GGGATATCTC GGCTCAGCGA TCGATGAAGA ACGTAGCAAA ATGGGATACT
2      .....C.....
1      TGCTGTGAAT TGCAGAAATCC GGTGAACCAT CCAGTTTTCG AACGCAAGTT GGGCCGACCG CCTTTTGGCC GAGGCCAGST
2      .....A.....
1      CTGGCTGGGC GTCAAGCATC GGTGCGGCCC GAACAA-----ATGTTG TTGGGGGCGG ATATTGGTCT
2      .....CG.....C.A.....
1      CCGGTGCTCA TGTGTGGTT GGCCAAAACA GGAGTAOCT- T-CGATGGAC GCAAGAACTA GTGTGGTGC TAAAAACCT
2      .....C.....T.....C.....A.....
1      GGTTCCTTCG TCTGTGCTA- -GTGGCAAG GAAAACTGT TCAATAAACC CCAATGTGTT GTCTTAGGAT GACGCTTCG-
2      .....T..T....TCGT TC..T...T..G..C..C..AT...A...

```

图 (1) 两种菊科植物的 ITS 序列

Fig.1 The ITS sequences of two species in the family Compositae

1 *Pyrethrum cinerifolium* 2 *Chrysanthemum segetum*

结果与讨论

通过比较这两条序列, 可以看出: 除虫菊和茼蒿的同源百分率为 87.4%, 多态性百分

率为7.4%。其中 ITS1 为 245bp, 248bp, ITS2 为 200bp, 202bp, ITS1 比 ITS2 分别长 45bp, 46bp。而在 Cucurbitaceae, Scrophulariaceae, Viscaceae 中, ITS2 比 ITS1 稍长, 在茄科中两者差不多长, 在豆科、禾本科和蔷薇科中则不一定。在研究过的被子植物中, 5.8s rDNA 的长度几乎是不变的, 为 163bp 或 164bp (Bruce 等, 1995), 菊科植物中也如此, 且它很保守, 只在 5' 端和 3' 端有变异。

这两种植物的 ITS1 和 ITS2 的 G + C 大约相当, 这种现象符合 GC 平衡 (G + C content balance), 如茼蒿中 ITS1 和 ITS2 分别为 48.8%, 50.0%, 除虫菊中 ITS1 和 ITS2 为 47.8%, 50.5%。GC 平衡在被子植物中普遍存在, 如葫芦科中 melon ITS1 和 ITS2 的 G + C 为 56%, 60% (Kavanagh 等, 1988), Mung bean 为 60%, 59% (Schiebel 等, 1989), Tomato 为 68%, 71% (Kiss 等, 1988)。GC 平衡现在还未解释清楚, 可能的原因有: 1) ITS1 和 ITS2 和核糖体 RNA 的成熟有关, 本身会形成茎环状二级结构。特殊有序的结构有利于 ITS1 和 ITS2 的切除, GC 平衡反映了一种选择压力 (Ramon 等, 1990); 2) 和环境因素有关, 尤其是温度 (Bernardi 等, 1988)。生长在温和地区的被子植物的 G + C 要比生活在干旱地区的被子植物高 (Salinas 等, 1988)。因为富含 GC 有利于保证在 DNA, RNA 的热稳定性。

结合前人的研究结果, 我们从基因库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) 中录取了几种菊科植物 (*Bidens ferulifolia* U67108, *Cosmosatro sanguineus* AF165847, *Dahlia scapigeroides* AF165845, *Rachelia glaria* AF115923, *Raoulia* sp CANU3459 AF115924, *Dendranthema grandifolium* AF116239) 的 ITS 区和这两种植物进行比较, 发现除虫菊和茼蒿的 ITS2 要比其他菊科植物的短些, 分别为 200bp, 202bp。主要原因是在 ITS 区的 437bp 处有一段 17bp 的缺失 (或插入), 而在 ITS1 中没有大片段的插入或缺失现象, 只有 1~4bp 的插入或缺失。在 ITS1 中有 65.2% 的变异位点, 在 ITS2 中有 53.7% 的变异位点。在除虫菊和茼蒿的点突变位点的比较中可以看到 TC 间的转换要高于 AG 间的转换。分析原因, ITS 区是一段高度甲基化的基因, 甲基化的 C 发生脱氨基反应生成 T。C-T 的转变在 ITS 的进化中起着重要的作用。

本文只是对除虫菊和茼蒿等植物的 ITS 区序列的初步探讨, 更多有关遗传信息的分子生物学问题还需作进一步研究。

致谢 实验过程中得到了昆明动物所分子遗传学开放实验室全体人员的帮助。

〔参考文献〕

- 顾红雅, 翟礼嘉译, 1998. 植物分子生物学——实验手册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 6~7
- Baldwin B G, Sanderson MJ, Porter J M, et al, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 82: 247~277
- Bernardi G, Mouchiroud D, Gautier C, 1988. Compositional Patterns in Vertebrate Genomes: Conservation and Change in Evolution [M]. *J Mol Evol*, 28: 7~18
- Kavanagh T A, Tinman J N, 1988. Structure of melon rDNA and nucleotide sequence of the 17~25s spacer region [J]. *Theor Appl Genet*, 76: 673~680
- Kiss T, Kiss M, Abel S, et al, 1988. Nucleotide sequence of 17s~25s spacer region from tomato rDNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 16: 7179

〔上接 54 页〕

Ramon A T, Canal M, Hemleben V, 1990. GC Balance in the Internal Transcribed Spacers ITS1 and ITS2 of Nuclear Ribosomal RNA Genes [J]. *J Mol Evol*, 30: 170 ~ 181

Salinas, Matassi G, Montero L M, *et al*, 1988. Compositional compartmentalization and compositional patterns in the nuclear genomes of plants [J]. *Nucleic Acids Res*, 16: 4269 ~ 4285

Schiebel K, Hemleben V, 1989. Nucleotide sequence of 18s ~ 25s spacer region from rDNA of mung bean [J]. *Nucleic Acids Res*, 17: 2852